

抗酸化作用および免疫調節作用を有する抗リウマチ剤の開発研究

| | |
|-----|---|
| 著者 | 種村 満 |
| 号 | 262 |
| 発行年 | 1986 |
| URL | http://hdl.handle.net/10097/15188 |

氏 名（本籍）
種 村 満

学 位 の 種 類
薬 学 博 士

学 位 記 番 号
薬 第 262 号

学位授与年月日
昭和61年12月10日

学位授与の要件
学位規則第5条第2項該当

学 位 論 文 題 目
抗酸化作用および免疫調節作用を有する抗
リウマチ剤の開発研究

論文審査委員
(主 査)
教授 橋 本 嘉 幸
教授 福 本 圭 一 郎
教授 佐 藤 進

論 文 内 容 要 旨

活性酸素分子種の生体内反応における役割がようやく解明されつつあり、その正常な代謝過程における意義と併せて、いわゆる酸素毒としての論議も活発に行われている。

一般に活性酸素種の細胞内濃度は消去系の働きにより低く保たれていると考えられているが、何らかの理由により消去系の機能が低下したり、逆に活性酸素種が生体の処理能力以上に産生されたときには、細胞構成成分が無差別に酸化され細胞障害をもたらすようになると考えられている。すなわち、炎症、免疫反応、発癌、動脈硬化、老化などの医学的現象はフリーラジカルあるいは活性酸素種に対する生体の防御機構の破綻によってもたらされるという説もある。

そこで、活性酸素種が関与する生体内反応は抗酸化性化合物あるいは遊離基捕捉作用を有する化合物によって影響されるものと考えられる。

このような発想から、分子軌道エネルギー準位を量子化学的手法を用いて計算し、電子供与性化合物（抗酸化性化合物）をデザイン、合成した。その薬効スクリーニングを行った結果、iminodibenzoic acid誘導体は電子供与性化合物として、生体内抗酸化性化合物と考えられているVitamin A, ascorbic acidおよび α -tocopherolと同じように抗酸化能を有することが明らかとなった。Iminodibenzoic acid誘導体はUllmann反応を利用して合成し、そのin vitroにおける抗酸化作用はUdenfriend系を用いてhydroxyl radical捕捉作用を指標として検討した。その結果、これらの化合物はhydroxyl radical捕捉作用が非常に強いことが明らかとなった。

一方、Di Luzioらはアルコール性肝障害の発生機序は過酸化脂質の形成が主因であり、アルコール摂取による肝障害は抗酸化性化合物であるdiphenyl-p-phenylenediamine (DPPD) や α -tocopherolによって抑制されると報告している。

そこで、ラットを用いこれらの化合物のアルコール脂肪肝に対する影響を検討した。その結果、4-chloro-2,2'-iminodibenzoic acid disodium salt (CCA) がすぐれた活性を有することが明らかとなった。

次に、他の抗酸化剤との比較を行ったところ、CCAはVitamin A, α -tocopherolおよびDPPDに次ぐ抗酸化能を有し、in vitroの抗酸化作用は、hydroxyl radical捕捉剤であるsodium benzoateやD-mannitolよりも強く、さらにCCAのラットアルコール脂肪肝抑制作用はDPPDよりも強い効果を有することが明らかとなった。CCAのアルコール脂肪肝抑制作用はアルコール投与によって生じる過酸化脂質あるいは遊離基の捕捉作用によることが示唆された。

抗酸化性化合物のVitamin A並びに α -tocopherolはin vitroおよびin vivoにおいてマウス免疫応答を増強することが知られている。またlevamisoleは免疫調節作用を有するが、その作用機序のひとつとして抗酸化作用があげられている。実験の結果、levamisoleはCCAと同程度

のhydroxyl radical捕捉作用を有することが明らかとなった。一方、リンパ球の機能は活性酸素によって障害されるが、その障害は活性酸素消去剤によって解除されることが知られている。

このように抗酸化性化合物は免疫系に何らかの影響を及ぼすと考えられたので、CCAの免疫系に対する影響を検討した。その結果、ある条件下において、CCAは正常マウス脾細胞のplaque forming cell (PFC) 産生に対して、helper T cellまたはB cell系の賦活効果により、免疫増強作用を有することが明らかとなった。

遺伝的にT cell欠損マウスとして知られているヌードマウスにおいて、CCAは抗LPS抗体産生PFC産生反応を促進することが判り、また脾細胞に存在するT cell前駆細胞であるThy-1⁺ cellの割合を増加させ、本マウスにおけるT cell dependent antigen (SRBC) に対する抗体産生能の増強作用が認められた。また、suppressor T cell機能に遺伝的不全が認められているNZB/WF₁ マウスにおいて、CCAは本マウスのsuppressor T cell機能の回復効果を有することが明らかとなった。これらの結果はCCAが免疫不全の回復作用を有することを示唆している。また、CCAはcortisone acetateにより人為的に免疫抑制を惹起したマウスの脾細胞における抗SRBC PFC産生の低下に対して拮抗的に作用し、正常レベルまで回復することも判明した。

このように、CCAは免疫抑制状態にあるときには促進的に働き、免疫亢進状態にあるときには抑制的に働く免疫調節剤としての性質を有している。

一方、CCAは正常マウスの胸腺組織中のcyclic GMPを増加させる。胸腺細胞は未熟なT cellおよびその成熟化を促進する胸腺ホルモンを産生する上皮性細胞の2種よりなっており、CCAの標的細胞がいずれであるか今後解明しなければならないと考えられる。いずれにしても、CCAの免疫増強作用の機序のひとつとして、胸腺細胞の賦活化が関与していることが示唆された。

マウスにcorticosteroidを投与すると胸腺の萎縮が起り、免疫反応が低下することが知られている。そこで、dexamethasone処置マウスにおける胸腺の萎縮に対するCCAの影響を検討した結果、CCAはdexamethasoneによる胸腺の萎縮に拮抗的に作用することが明らかとなった。一方、CCAは正常マウスの生理的な胸腺の自然退縮には何ら影響を及ぼさなかった。このことは、CCAがcorticosteroidなどの免疫抑制剤により惹起された胸腺の萎縮を抑制するが、生体の恒常性を保つための生理的現象である胸腺の自然退縮に対して影響を与えないことは望ましい結果と考えられた。

このようなCCAの薬理学的性質から、免疫系に何らかの異常を有する自己免疫疾患モデルに対して、CCAはその異常を正常化することにより、何らかの影響を与えるものと考えられた。

自己免疫疾患のひとつと考えられているリウマチの病態モデルであるラットのアジュバント関節炎は発症と進展に細胞性免疫の関与が指摘されており、とくに胸腺細胞由来の suppressor T cell により支配されていると考えられている。そこで、この関節炎に対する CCA の影響について検討した。また、ある種の抗酸化性化合物は抗炎症作用を有することが知られており、CCA の抗炎症作用についても検討を加えた。

ラットアジュバント関節炎に対する CCA の予防効果はアジュバント注射の 3 日前から実験終了まで CCA (100mg/kg/day) を 25 日間連続経口投与した。その結果、感作後 14 日目から対照群と比べて、CCA 投与群では関節炎の発症と重症度の軽減が認められ、19、21 日目の後肢腫脹容積の減少が認められた。また、治療実験においてはアジュバント感作後、17 日目より 1 日 1 回計 7 日間薬物を投与した。その結果、CCA (10、50mg/kg) 処置群は対照群に比べてもっとも後肢腫脹容積の減少が認められた。標準薬として用いた抗炎症剤の phenylbutazone (10mg/kg/day) は投与期間中は有効であったが、後肢腫脹容積は CCA (10、50mg/kg/day) 処置群とは異って、処置後徐々に対照群の後肢腫脹容積とほぼ同程度まで悪化した。さらにアジュバント関節炎ラットでは、胸腺の萎縮が認められたが、CCA (50mg/kg/day) 処置により胸腺の萎縮に対して拮抗的に作用することが判明した。

一方、CCA は抗炎症剤である mefenamic acid と類似した化学構造を有するが、ラット carrageenin 足浮腫試験において、CCA は抑制作用を示さず、また肉芽腫試験においても増殖抑制効果を示さなかった。CCA は炎症反応に関与すると考えられている PGE₂ 生合成反応に何ら影響を及ぼさず、また鎮痛作用も示さなかった。且つ、CCA はラット、モルモットを用いた passive cutaneous anaphylaxis 反応も抑制しなかった。このように、CCA は鎮痛、抗炎症作用および抗アレルギー作用は有していないことが明らかとなった。

これらの結果から、CCA は非免疫学的機作に基づく炎症モデルにおいては、ほとんど抑制効果を示さず、その発症の機作に免疫系の関与するラットアジュバント関節炎において特異的な予防、治療効果を示した。CCA によるこの効果は、これまで述べてきたように免疫調節作用に基づくものと考えられる。恐らく、CCA が suppressor T cell 機能を賦活化することにより関節炎に対して抑制的に働くことが示唆された。

このように、CCA は抗炎症、鎮痛作用および免疫抑制作用を有しておらず、既存の抗リウマチ剤とはまったく作用機序の異なる免疫調節作用を有する新しいタイプの抗リウマチ剤となる可能性が示された。

以上のような薬理学的特徴から、CCA は慢性関節リウマチの治療剤としての有用性が期待され、実際、全国規模の多施設二重盲検法による臨床試験が行われた結果、CCA は慢性関節リウマチの治療に有効な薬剤であると評価された。

審 査 結 果 の 要 旨

生体内で生産される活性酸素は、細胞傷害作用により種々の生体機能を傷害する。正常の状態では、この活性酸素を不活性化する酵素の働きで体は恒常性を維持しているが、何らかの原因でこの酵素の機能が低下すると活性酸素による傷害が惹起される。このような活性酸素の傷害防止の観点から、抗酸化作用をもつ薬剤や活性化酵素の補足作用をもつ薬剤などが必要とされる。

本研究は抗酸化作用を持つ化合物を、電子論的なデザインにより合成し、その抗酸化作用の検討を行った後に、生体の免疫系に対する効果並びにリウマチに対する治療効果などについて検索している。

上記目的に沿って、先ず 抗酸化作用を有するiminodibenzoic acid誘導体の合成を試み、種々の反応条件の検討の結果、12種の誘導体の合成に成功した。合成した化合物は、in vitroに於てhydroxyl radical補足作用を示すこと、また、in vivoに於て活性酸素により媒介されると思われるアルコール脂肪肝における組織中のトリグリセライドの蓄積作用を抑制した（第1章）。

これらの化合物の中で、最も活性の高かったdisodium 4-chloro-2,2'-iminodibenzoate (CCA) について、その抗酸化作用を精査した。その結果、CCAは既知のhydroxyl radical捕捉剤に比べ、同等またはそれ以上の活性を示すことが明かとなった（第2章）。

次に、CCAの示す免疫調節作用について検討した。その結果、本化合物は抗体産生系におけるT細胞ならびにB細胞の機能を増強させること、免疫不全マウスの機能回復効果を示すこと、またコーチソンによる抗体産生抑制を回復させる作用をもつことなどが明らかにされた。さらにCCAは胸腺組織中のサイクリックGMPを増加させることも判明した（第3章）。以上の結果に基づいてCCAの胸腺に対する効果も併せて検討したところ、CCAはホルモンやアルコールなどによる胸腺萎縮に対して防止効果を示すことも明らかにされた（第4章）。

最後に、CCAの疾患への適用を計るため、CCAの抗炎症効果について検討した。CCAは主として非免疫学的作用機作に基づくと考えられる炎症モデルにおいては、殆ど抑制効果を示さなかったが、アジュバント関節炎は抑制することが示された。この結果から、CCAは慢性リウマチの治療薬として有用と考え、臨床試験を行った結果、その有効性が示された（第5章）。

以上の研究結果は理論的な薬のデザインにより、新しい抗リウマチ剤をうみだした点高く評価され、本論文は博士論文として評価される。